

OSSERVAZIONI EPIDEMIOLOGICHE SU UN MARCIUME BATTERICO DELLA LATTUGA.¹

A. ZOINA, A. RAIO, G. DEL SORBO, M. LORITO, F. SCALA

Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

RIASSUNTO

Xanthomonas campestris pv. *vitians*, agente di un marciume della lattuga, presenta una fase di sviluppo epifitico che può condurre alla costituzione di un considerevole potenziale di inoculo; la malattia si manifesta se si verificano fenomeni piovosi persistenti e prolungati. Le erbe infestanti possono avere un certo ruolo nel ciclo della malattia. Trattamenti preventivi con flumechina, phosethyl-Al, rame ammoniacale ed idrossido di rame sono risultati inefficaci; la flumechina alla dose di 30 ml/hl ha causato lievi sintomi di fitotossicità sulla cv Nabucco. Ventidue campioni di seme reperiti in commercio nel 1991 sono stati esaminati tramite IF ed otto sono risultati contaminati dal patogeno. Sono stati sperimentati mezzi fisici e chimici di decontaminazione dei semi. La suscettibilità delle piante alla malattia è correlata positivamente allo sviluppo vegetativo.

SUMMARY

Epidemiological studies on bacterial head rot of lettuce. Severe epidemics of bacterial head rot of lettuce occurred in 1988 and 1989 in autumn crops in southern Italy. Some epidemiological investigations for the prevention and the control of the disease were conducted. *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* has an epiphytic growth phase that may result in the building up of a massive inoculum. Severe outbreaks may occur after prolonged rainy periods and weeds may play a role in the disease cycle. Flumequine, phosethyl-Al, copper ammonium and copper hydroxide did not control the disease when weather conditions were favourable for the pathogen. Flumequine (0.3 ml/l) was slightly phytotoxic to cv Nabucco. The disease can be transmitted by seeds. Eight out of twenty-two samples of commercial seed were found to be contaminated by the pathogen when examined by IF. Attempts were made to disinfest the seeds by chemical and physical means, but flumequine and sodium hypochlorite were the most successful treatments. Field experiments showed that lettuce susceptibility increases with plant growth.

INTRODUZIONE

Xanthomonas campestris pv. *vitians* (Brown) Dye (XCV), agente di un marciume batterico della lattuga, è diffuso in tutto l'areale di coltivazione di questo ortaggio e, anche se raramente, può causare danni molto gravi alle coltivazioni (Patterson *et al.*, 1986). In Italia la malattia è stata segnalata anni

¹Lavoro effettuato nell'ambito del Gruppo di Ricerca del CNR "Patologia delle Pianta Ortensi". Pubblicazione No 282.

fa in Campania (Ragozzino, 1969) e successivamente, in forma molto grave, in Sicilia (Pennisi e Pane, 1990). Attacchi molto violenti, che hanno comportato la perdita totale della produzione su estese superfici, sono stati da noi riscontrati in Calabria nel 1988 ed in Campania nel 1989. In entrambi i casi gli attacchi hanno riguardato coltivazioni autunno-vernine di lattuga del tipo iceberg. Durante gli anni successivi, nelle coltivazioni delle due regioni tenute sotto osservazione, la malattia è stata osservata solo sporadicamente ed in forma limitata a pochi focolai. In seguito agli scoppi epidemici verificatisi sono state condotte osservazioni e prove, sia in campo che in laboratorio, al fine di indagare su alcuni aspetti epidemiologici della malattia ed individuare strumenti per il suo contenimento.

MATERIALI E METODI

Esame di semi e piante mediante IF

Sono stati esaminati con la tecnica di immunofluorescenza indiretta 22 campioni di semi di lattuga reperiti in commercio e provenienti da altrettanti lotti. I semi sono stati sottoposti ad un processo di estrazione secondo il protocollo di Schaad (1989). Lo stesso protocollo, leggermente modificato, è stato utilizzato per il trattamento di campioni di lattughe asintomatiche e di piante infestanti raccolti in coltivazioni di lattuga in cui erano presenti focolai della malattia.

L'antisiero usato per le analisi è stato preparato immunizzando conigli Nuova Zelanda con una sospensione di cellule (1×10^9 ml⁻¹) bollita per 20 minuti. Successivamente, l'antisiero è stato reso specifico mediante adsorbimento con una sospensione di cellule di *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (1 ml di antisiero è stato incubato con 1 ml di sospensione contenente 10^9 cfu). L'antisiero adsorbito, saggiato con 26 ceppi batterici, ha reagito solo con gli isolati di XCV.

Trattamenti ai semi e tentativi di lotta chimica

Semi della cv. Nabucco, contaminati artificialmente con una sospensione (1×10^8 cfu ml⁻¹) di un mutante spontaneo di XCV resistente alla rifampicina, sono stati sottoposti a decontaminazione sia per mezzo del calore che tramite concia chimica. I prodotti chimici utilizzati nella prova sono stati: bronopol, flumechina, mancozeb, rame ammoniacale, rame idrossido, sodio ipoclorito, thiram. Tutti i prodotti, tranne il sodio ipoclorito, sono stati somministrati sotto forma di slurry; la tabella 1 riporta le loro concentrazioni di impiego e le modalità degli altri trattamenti. Per ogni condizione è stato utilizzato un grammo di semi. Dopo il trattamento 200 semi sono stati distribuiti in 4 capsule Petri contenenti agar nutritivo-saccarosio addizionato con rifampicina 50 ppm; l'eventuale sviluppo di XCV intorno ai semi è stato controllato dopo 7 e 14 giorni di incubazione a 28 °C. Cinquanta semi sono stati posti su agar-acqua ed incubati a 21 °C per controllarne la germinazione.

Nell'autunno 1993 è stata realizzata una prova di lotta chimica nella quale sono stati utilizzati i seguenti prodotti: 1) phosethyl-Al (Aliette, p.a. 80%); 2) rame ammoniacale-sale polimerico (Cobox L, Cu 150 g/l); 3) rame

ammoniacale (Copac E, Cu 28 g/l); 4) flumechina (Firestop, p.a. 15%); 5) rame idrossido (Kocide 101, Cu 50%). La prova è stata impostata secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con tre replicazioni. Le parcelle erano costituite da file di 10 piante poste a dimora il 6/9/93. L'inoculazione è stata effettuata il giorno 5/10/93 nebulizzando sulle piante una sospensione del ceppo XCV 873 contenente 1×10^8 cfu ml⁻¹. Il giorno precedente erano iniziati i trattamenti proseguiti con cadenza decadale fino al 3/11/93. La distribuzione e l'intensità delle precipitazioni durante la prova sono state tali da assicurare le condizioni ideali per lo sviluppo della malattia. Il 25/10/93 ed il 10/11/93 sono stati rilevati il numero delle piante attaccate e la gravità dei sintomi in base ad una scala sintomatologica compresa tra le classi 0 e 3 (0 = nessun sintomo; 1 = sintomi lievi; 2 = sintomi gravi sulle foglie esterne; 3 = sintomi gravi anche sulle foglie interne). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza ed al test DMS.

Influenza della concimazione e dell'età delle piante sull'incidenza e sulla gravità della malattia.

Per verificare l'effetto dell'età delle piante e della concimazione sulla comparsa e sull'evoluzione della batteriosi, in una prova di campo sono state messe a confronto piante di tre età (4, 6 ed 8 settimane) concimate con azoto (150 U/ha) e con fosforo (100 U/ha) da soli ed in combinazione.

I trapianti sono stati effettuati a metà e fine settembre ed a metà ottobre utilizzando piantine di un mese di età della cv Nabucco. Il fosforo è stato distribuito in un'unica soluzione all'inizio della prova, mentre l'azoto è stato somministrato in due riprese, metà al trapianto e metà due settimane dopo. Si è adottato uno schema sperimentale a parcella suddivisa con quattro replicazioni; alle parcelle principali sono state assegnate le dosi di fertilizzante ed alle parcelle elementari l'età delle piante al momento dell'inoculo. Due giorni dopo l'ultimo trapianto tutte le parcelle sono state irrorate abbondantemente con una sospensione di XCV (1×10^8 cfu ml⁻¹). Il rilievo dei sintomi è stato effettuato a 3, 5 e 9 settimane dall'inoculazione sulla base della scala sintomatologica descritta in precedenza.

RISULTATI

Esame di semi e piante mediante IF.

L'osservazione in fluorescenza ha consentito l'individuazione del patogeno in otto dei ventidue campioni esaminati; tre lotti di semi sono risultati fortemente contaminati. Il batterio è stato isolato da un solo campione; negli altri casi o la sua crescita in coltura è stata ostacolata dal più rapido sviluppo della microflora saprofita, oppure esso aveva perso vitalità.

Tutti i campioni di lattughe asintomatiche prelevati da coltivazioni con attacchi in atto sono risultati positivi all'esame IF dimostrando la presenza, in genere piuttosto abbondante, di XCV allo stato di epifita. Il batterio è stato evidenziato anche nella maggior parte delle piante spontanee esaminate. Esso è stato infatti osservato nei preparati provenienti da campioni di *Amaranthus lividus* L., *Amaranthus* sp., *Anni majus* L., *Capsella bursa-pastoris* (L.)

Medicus, *Chenopodium* sp., *Convolvulus* sp., *Daucus carota* L., *Galinsoga parviflora* Cav., *Lolium multiflorum* Lam., *Malva sylvestris* L., *Matricaria camomilla* L., *Rumex* sp., *Sinapis arvensis* L., *Solanum nigrum* L., *Sonchus oleraceus* L., *Trifolium* sp., *Xanthium spinosum* L. ma non da quelli di *Euphorbia elioscopica* L., *Rumex crispus* L. e *Sonchus asper* (L.) Hill.

Trattamenti ai semi e tentativi di lotta chimica.

La tabella 1 illustra, in ordine di efficacia crescente, gli esiti dei trattamenti effettuati sui semi. I valori dell'ultima colonna rappresentano le percentuali dei semi dai quali si è avuto sviluppo di XCV e che quindi, dopo il trattamento sono risultati ancora contaminati.

Tab. 1 - Trattamenti ai semi.

Trattamenti	Concentrazione di p.a. (ppm)	% Semi contaminati
bronopol	1000	100,0 a
bronopol	2000	100,0 a
acqua 42°C 60 min.		100,0 a
stufa 70°C 24 ore		100,0 a
stufa 70 °C 48 ore		100,0 a
stufa 70° C 72 ore		98,7 a
stufa 70° C 96 ore		98,7 a
mancozeb	3000	97,5 a
mancozeb	6000	97,5 a
Cu idrossido (Cu 30%)	2100	97,5 a
acqua 44°C 60 min.		97,5 a
Cu ammoniacale (Cu 15%)	975	96,2 a
Cu idrossido (Cu 30%)	4200	88,7 ab
Cu ammoniacale (Cu 15%)	1950	77,5 b
acqua 46° C 60 min.		60,0 c
bronopol	5000	51,2 cd
flumechina	300	43,7 de
Cu ammoniacale (Cu 15%)	4800	37,5 e
thiram	16000	37,5 e
Cu idrossido (Cu 30%)	10500	25,0 f
thiram	24000	17,5 fg
NaClO 1% 20 min.		15,0 fg
thiram		10,0 gh
flumechina	600	8,7 gh
NaClO 1% 40 min.		1,2 h
flumechina	1500	0,0 h
NaClO 1% 60 min.		0,0 h

I valori seguiti dalle stesse lettere non differiscono significativamente a $P=0,01$. Test di Duncan.

Soltanto i trattamenti con flumechina (1500 ppm) e con ipoclorito di sodio (1% Cl⁻ per un'ora) hanno completamente eliminato il patogeno dai semi, mentre le altre combinazioni hanno dato esiti insoddisfacenti; nessuno dei prodotti, comunque, ha influenzato la germinabilità dei semi. I trattamenti termici, contrariamente a quanto riportato in letteratura (Ohata *et al.*, 1982), hanno dato esiti deludenti. Il patogeno si è dimostrato molto resistente al calore secco, ed a 70 °C il 98% dei semi ha perso la capacità germinativa già dopo 24 ore. Il trattamento con acqua calda a 46 °C ha dato risultati poco soddisfacenti nei confronti del batterio mentre a 48 °C è stata gravemente compromessa la germinabilità del seme.

Anche nella prova di lotta effettuata in campo si sono avuti esiti negativi. Come si può infatti notare in tabella 2 non sono emerse differenze significative tra le diverse tesi ed il testimone non trattato; nessuno dei principi attivi impiegati ha ostacolato in qualche misura la progressione della malattia, anche se in saggi condotti *in vitro* con Cobox L, Kocide 101 e Firestop, si erano ottenute DL100 rispettivamente pari a 325, 75 e 20 ppm.

Tab. 2 - Trattamenti in campo.

Prodotto	Dose (p.a.)	Classe sintomatologica	
		1° rilievo	2° rilievo
phosethyl-Al	3,2 g/l	1,6 a	3 a
Cu ammoniacale (sale polimerico)	0,975 g/l	2,3 b	3 a
Cu ammoniacale	0,28 g/l	1,7 a	3 a
flumechina	0,3 ml/l	2,5 b	3 a
Cu idrossido	3,0 g/l	2,7 b	3 a
Testimone		1,6 a	3 a

Entro ogni colonna le medie con lettere diverse differiscono significativamente a P= 0,05. Test DMS.

Influenza dell'età e della concimazione sull'incidenza e la gravità della malattia. La tabella 3 riporta la distribuzione percentuale delle piante ammalate nelle quattro classi sintomatologiche adottate così come è apparsa nelle tre successive rilevazioni. Risulta evidente la forte influenza dell'età sulla sensibilità alla malattia; le piante più vecchie infatti sono state percentualmente più colpite, ed in modo più grave, di quelle più giovani. Con il passare del tempo un numero crescente di piante ha contratto la malattia e la gravità dei sintomi è aumentata progressivamente. Anche la concimazione, indipendentemente dall'età delle piante, ha notevolmente influito sull'incidenza e sulla gravità della malattia. In ognuno dei tre rilievi è stata osservata una percentuale di piante malate significativamente minore e con sintomi più lievi nelle parcelle non concimate. L'incidenza e la gravità della malattia, inoltre, sono aumentate con il crescere degli apporti nutritivi.

Tab. 3 - Influenza dell'età e della concimazione: distribuzione percentuale delle piante malate nelle quattro classi sintomatologiche.

Tempo trascorso dall'inoculazione	Trattamento		Classe sintomatologica			
			0	1	2	3
3 settimane	Età delle piante all'inoculazione (settimane)	4	99,7b	0,3a	0	0
		6	97,2b	2,8a	0	0
		8	90,0a	10,0b	0	0
	Concimi	N ₀ P ₀	95,4a	4,6a	0	0
		N ₀ P ₁	96,2a	3,8a	0	0
		N ₁ P ₀	97,5a	2,5a	0	0
		N ₁ P ₁	93,3a	6,7a	0	0
5 settimane	Età delle piante all'inoculazione (settimane)	4	70,4c	29,3a	0,3a	0a
		6	50,3b	49,7b	0a	0a
		8	30,0a	56,6b	11,2b	2,2a
	Concimi	N ₀ P ₀	66,2c	33,8a	0a	0a
		N ₀ P ₁	53,3b	45,8b	0,9a	0a
		N ₁ P ₀	50,4b	44,2b	5,4b	0a
		N ₁ P ₁	31,7a	57,1c	7,9b	3,3a
9 settimane	Età delle piante all'inoculazione (settimane)	4	0	80,9c	19,1a	0a
		6	0	35,9b	62,5b	1,6a
		8	0	11,6a	25,0a	63,4b
	Concimi	N ₀ P ₀	0	44,6ab	43,3b	12,1a
		N ₀ P ₁	0	42,1ab	31,9ab	20,0ab
		N ₁ P ₀	0	50,0b	26,7a	23,3bc
		N ₁ P ₁	0	34,6a	34,2ab	31,2c

I valori seguiti da lettere diverse sono significativamente differenti a $P=0,01$. Test di Duncan.

N₀P₀ = nessun elemento

N₀P₁ = P₂O₅ 100 U/ha

N₁P₀ = azoto 150 U/ha

N₁P₁ = azoto 150 U/ha, P₂O₅ 100 U/ha

0 = nessun sintomo

1 = sintomi lievi

2 = sintomi gravi sulle foglie esterne

3 = sintomi gravi anche sulle foglie interne

CONCLUSIONI

Gli scoppi epidemici di marciume batterico del 1988-89 si sono verificati in coltivazioni di lattuga di pieno campo, entrambi a cavallo dei mesi di ottobre e novembre, quando le piante erano in fase di maturazione ed in seguito a piogge persistenti e prolungate. Nè in precedenza, nè in seguito si è avuta occasione di osservare il fenomeno con simile intensità.

In seguito a prove effettuate tra il 1990 ed il 1991 è stata dimostrata la trasmissibilità della malattia attraverso il seme (Zoina e Volpe, 1992). Questa possibilità, fino ad allora, era stata ipotizzata da diversi Autori (Harrison, 1963, Ragozzino, 1967), ma non completamente dimostrata (Ohata *et al.*, 1982). Ciò potrebbe in parte spiegare una certa mancanza di attenzione dei produttori di semente rispetto a XCV e quindi la presenza sul mercato di semi contaminati, anche pesantemente, dal patogeno.

Il batterio è stato trovato, in genere in quantità elevate, sulle foglie di piante di lattuga asintomatiche e ciò è un forte indizio delle sue capacità di colonizzare il filloplano; è stato inoltre rinvenuto, probabilmente come epifita

occasionale, su piante spontanee e sarà interessante verificare il loro possibile ruolo nella perpetuazione del patogeno.

E' interessante, inoltre, notare che la recettività delle piante alla malattia risulta fortemente influenzata dall'età e dagli apporti nutritivi; in sostanza la suscettibilità delle piante è correlata allo sviluppo vegetativo ed aumenta progressivamente con l'avvicinarsi della maturità.

Una volta avvenuta l'infezione e persistendo condizioni di elevata umidità, è molto difficile contrastare il progresso della malattia con i mezzi chimici attualmente disponibili così come ha indicato la nostra prova. La prevenzione, pertanto, come del resto per tutte le batteriosi, è il criterio basilare di lotta alla malattia. E' perciò fondamentale utilizzare seme sano, attuare lavorazioni al terreno che favoriscano la totale degradazione dei residui della vegetazione precedente, adottare, se necessario, turni di rotazione adeguati ed eliminare anche le infestanti in caso di attacchi alle coltivazioni.

E' stato riscontrato, infine, un effetto positivo di pratiche colturali quali la diminuzione (da 150 a 120 U/ha) ed un maggior frazionamento (da 2 a 3) degli apporti azotati e la copertura delle colture con TNT (tessuto non tessuto) che uniforma ed aumenta di 2-3 °C la temperatura degli strati dell'aria più prossimi al terreno e protegge le piante dall'azione battente della pioggia riducendo così la possibilità del verificarsi della congestione idrica nei tessuti fogliari.

LAVORI CITATI

- HARRISON D.E., (1963). Leaf spot and dry rot of lettuce caused by *Xanthomonas vitians* (Brown) Dowson. Austr. J. Agr. Res. 14, 778-784.
- OHATA K., SERIZAWA S., AZEGAMI K., SCIRATA A., (1982). Possibility of seed transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the pathogen of bacterial spot of lettuce. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences, (Japan), 36, 81-88.
- PATTERSON C.L., GROGAN R.G., CAMPBELL R.N., (1986). Economically important diseases of lettuce. Plant Disease, 70, 982-987.
- PENNISI A.M., PANE A., (1990). Gravi epidemie di *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Brown) Dye su lattuga in Sicilia. Informatore Fitopatologico, 40, 56-58.
- RAGOZZINO A., (1969). Due batteriosi della lattuga (*Lactuca scariola* L. var. *sativa*). Riv. Ortoflor. Ital., 53, 71-81.
- SCHAAD N.W., (1989). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. p 68-75. In: Detection of bacteria in seed, SAETTLER A.W., SCHAAD N.W. and ROTH D.A., eds., 122p., APS Press.
- ZOINA A., VOLPE E., (1992). Epidemiological aspects of lettuce bacterial spot induced by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. 8th ICPPB, Versailles 9-12 June. (Abstract, P3/A12).